

RÉF 10207-4 4 x 29 ml / 8 ml

BILIRUBINE TOTALE (TBIL)

Chaque cartouche contient un volume utilisable de 29 ml de réactif R1 et 8 ml de réactif R2.

UTILISATION PRÉVUE

Le réactif TBIL EasyRA permet de mesurer la quantité de Bilirubine totale dans le sérum et le plasma humains chez l'adulte, grâce à « l'analyseur de chimie clinique Medica EasyRA® ». Les mesures de Bilirubine permettent le diagnostic et le traitement de troubles hépatiques, hémolytiques et métaboliques, notamment l'hépatite et la lithiase biliaire.

Pour diagnostic *in vitro* uniquement. Réservé à un usage professionnel.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La bilirubine est un pigment dérivé de l'hémoglobine. Produite par la destruction des globules rouges, elle est présente dans le sérum. Une augmentation du taux de bilirubine peut être liée à des processus hémolytiques, des affections hépatiques ou des troubles du système biliaire. Il existe deux formes de bilirubine : non conjuguée (indirecte) et conjuguée (directe). La bilirubine non conjuguée est transportée dans le foie, où elle se lie à l'albumine et se conjugue (forme directe) avec l'acide glucuronique, qui est ensuite excrété. La bilirubine indirecte n'est pas soluble dans les solutions aqueuses. L'utilisation d'alcools ou de solvants est nécessaire à sa solubilisation. Les dosages réalisés à l'aide de ce type de solvants permettent d'obtenir les taux de la bilirubine totale. Les conjugués mono- et diglucuronides de la bilirubine sont solubles dans l'eau. Ce type de dosages permet de mesurer la bilirubine directe. La méthode standard implique la réaction de la bilirubine avec un réactif de diazotation (acide sulfanilique diazoté, par exemple) pour former un composé coloré, l'azobilirubine. Des additifs tels que l'éthanol¹ la caféine² ou le DMSO³ ont été ajoutés pour accélérer la réaction et la formation d'azobilirubine. Des surfactants agissant comme agents de solubilisation ont également été ajoutés.⁴

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Cette méthode de dosage en point final sert à mesurer la bilirubine totale (conjuguée et non conjuguée) liée au sel de 2,4-dichlorophényl-diazonium, en présence de surfactant, pour former l'azobilirubine.

Surfactant

Bilirubine totale +2,4-dichlorophényl-diazonium → Azobilirubine

L'augmentation de l'absorbance, mesurée à 550 nm, est directement proportionnelle à la concentration en bilirubine totale de l'échantillon.

RÉACTIFS

Réactif TBIL (R1) :

NaCl	154 mmol/l
HCL	190 mmol
Surfactants et conservateurs	

Réactif TBIL (R2) :

HCL	417 mmol
Sel de 2,4-dichlorophényl-diazonium	5 mmol/l

Surfactant

Précautions

1. Les bonnes pratiques de sécurité en laboratoire doivent être respectées lors de la manipulation des réactifs de laboratoire. (CLSI, GP17-A2).
2. Les réactifs (R1 et R2) sont des solutions acides. NE PAS inhaler ni ingérer, et éviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact avec les yeux, rincer abondamment avec de l'eau et consulter un médecin. En cas de contact avec la peau, rincer immédiatement avec de l'eau pendant 10 minutes. En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin. Consulter la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations sur les risques, les dangers et la sécurité.
3. Comme pour toute procédure de test diagnostique, l'interprétation des résultats doit tenir compte des résultats de tous les autres tests ainsi que de l'état clinique du patient.
4. Utiliser uniquement des cuvettes à usage unique.

INSTRUCTIONS CONCERNANT LA MANIPULATION, LE STOCKAGE ET LA STABILITÉ DU RÉACTIF

Le réactif est fourni prêt à l'emploi. Le réactif non ouvert est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette, à condition d'être stocké entre 2 et 8 °C. Le réactif ouvert, conservé à bord de l'analyseur EasyRA dans le compartiment réfrigéré du réactif, est

stable pendant le nombre de jours programmés dans la puce RFID sur la cartouche de réactif. Ne pas utiliser le réactif s'il est trouble ou nuageux, ou s'il ne parvient pas à retrouver les valeurs de contrôle sérique connues.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS, STOCKAGE / STABILITÉ

Utiliser du sérum ou du plasma clair non hémolysé. Protéger les échantillons de la lumière directe du soleil ou des sources de lumière artificielle car la bilirubine (non conjuguée) est instable.⁵ Le dosage doit être effectué dans les 2 heures qui suivent le prélèvement car la bilirubine est instable dans l'échantillon. Si le dosage de ces échantillons ne peut être effectué dans cet intervalle de temps, conserver jusqu'à 3 jours entre 2 et 8 °C.⁶ Les échantillons peuvent aussi être conservés pendant 3 mois à -70 °C. Des tubes enduits d'héparine de lithium peuvent être utilisés pour le prélèvement du plasma.

PROCÉDURE

Matériel fourni

Cartouche de réactif Medica TBIL, Réf. 10207

Matériel auxiliaire nécessaire

Medica EasyCal – Chimie, Réf. 10651

Medica EasyQC®, Niveau A – Chimie/Électrolytes, Réf. 10793

Medica EasyQC, Niveau B – Chimie/Électrolytes, Réf. 10794

Cartouche de colorant pour test de précision Medica, Réf. 10764

Cartouche de nettoyant Medica – Chimie et électrodes sélectives, Réf. 10660 *ou*

Cartouche de nettoyant Medica – Chimie, Réf. 10661

Mode d'emploi

Le réactif est fourni prêt à l'emploi. Retirer le bouchon et placer le réactif dans le plateau de l'analyseur EasyRA, situé dans le compartiment réfrigéré de la cartouche. Un réactif ouvert est stable dans le compartiment réfrigéré de l'analyseur EasyRA pendant le nombre de jours programmés dans la puce RFID sur la cartouche de réactif (28 jours maximum), ou s'il est retiré et conservé réfrigéré à une température comprise entre 2° et 8° C (bouché) après l'ouverture.

Remarque : vérifier l'absence de mousse au niveau des collets de la cartouche après avoir retiré les bouchons et placé la cartouche sur l'analyseur. S'il y a de la mousse, procéder à son élimination à l'aide d'un écouvillon ou d'une pipette jetable avant d'effectuer le test. Utiliser des écouvillons ou pipettes jetables différents pour R1 et R2.

Étalonnage

Medica EasyCal - Chimie, Réf. 10651 est recommandé pour étalonner le dosage. L'intervalle d'étalonnage (7 jours maximum) est programmé dans la puce RFID sur la cartouche de réactif. Un nouvel étalonnage doit être effectué à chaque changement de numéro de lot de réactifs ou en cas d'écart entre les valeurs du contrôle de qualité.

Contrôle de qualité

Il est recommandé d'inclure deux niveaux de contrôle (normal et anormal) à base de sérum humain quotidiennement lors des tests patient et à chaque changement de numéro de lot de réactifs. Si les résultats du matériel de contrôle du dosage ne correspondent pas à l'intervalle de valeurs attendues, cela peut indiquer la présence d'une dégradation du réactif, d'un mauvais fonctionnement de l'instrument ou d'erreurs survenues au cours de la procédure. Le laboratoire doit respecter les réglementations locales, d'état et fédérales en matière de contrôle de qualité, lorsqu'il en utilise le matériel.

Résultats

Une fois le dosage terminé, l'analyseur chimique Medica EasyRA calcule la concentration en bilirubine totale à partir du rapport entre l'absorbance corrigée de l'échantillon à déterminer et l'absorbance corrigée de l'étalon, multiplié par la valeur de l'étalon.

$$TBIL \text{ (mg/dl)} = \frac{[(A_{U_{550}} - A_{U_{600}}) - (A_{R_{BIK_{550}}} - A_{R_{BIK_{600}}})] - [(A_{U_{550}} - A_{U_{600}}) S_{BIK} - (A_{R_{BIK_{550}}} - A_{R_{BIK_{600}}}) S_{BIK}]}{[(A_{C_{550}} - A_{C_{600}}) - (A_{R_{BIK_{550}}} - A_{R_{BIK_{600}}})] - [(A_{C_{550}} - A_{C_{600}}) S_{BIK} - (A_{R_{BIK_{550}}} - A_{R_{BIK_{600}}}) S_{BIK}]} \times dF \times CalValue$$

Où A_U et A_C représentent respectivement les valeurs d'absorbance de l'inconnu et de l'étalon. $A_{R_{BIK}}$ correspond à l'absorbance du blanc du réactif, S_{BIK} au blanc de l'échantillon, et « Cal Value » à la concentration en bilirubine totale de l'étalon (mg/dl). La réaction étant modifiée sous l'ajout, dans un deuxième temps, du réactif R2, un facteur de correction de dilution (dF) est intégré au calcul.

Le blanc de l'échantillon est corrigé pour la différence liée au facteur de dilution introduite par l'utilisation de R1 versus R2 + R1, selon la formule suivante :

$$dF = \frac{\text{Vol. réactif}_1 + \text{Vol. dilution} + \text{Vol. échant.}}{\text{Volume total}}$$

Valeurs attendues ¹⁰

L'intervalle des valeurs de référence pour la bilirubine totale dans le sérum est le suivant :

Adulte : de 0,2 à 1,0 mg/dl

Ces valeurs sont fournies à titre indicatif. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir son propre intervalle de valeurs attendues, compte tenu des différences qui existent entre les instruments, les laboratoires et les populations locales.

Limites de la procédure (si les valeurs de l'échantillon sont au-dessus de la limite supérieure de l'intervalle, par exemple)

Utiliser uniquement des échantillons de sérum ou de plasma non hémolysé. Ce dosage n'a pas été testé sur les nouveau-nés.

L'analyseur EasyRA signale tout résultat supérieur à 20 mg/dl en Haute Linéarité « HL ». Si l'icône de « répétition » est sélectionnée par l'opérateur, l'échantillon peut être à nouveau testé avec la moitié (1/2) de son volume. Le calcul des résultats issus de la répétition du test prend en compte la diminution de la taille de l'échantillon. Cela aura pour conséquence d'allonger l'intervalle rapporté du dosage de la bilirubine totale jusqu'à 40 mg/dl.

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES⁹

Intervalle rapporté

L'intervalle rapporté est compris entre 0,08 et 20 mg/dl. Il est compris entre 0,08 et 40 mg/dl lorsque la moitié de l'échantillon est utilisée (dilution à 1:1).

Inexactitude/corrélation (CLSI, EP9-A2)

Le tableau suivant regroupe les données obtenues lors d'une comparaison de la performance entre le réactif TBIL Medica (y) avec l'analyseur EasyRA (y) et un réactif TBIL semblable (x) avec l'analyseur Roche COBAS MIRA*. Les données fournies ci-dessous correspondent à des dosages uniques obtenus sur l'analyseur EasyRA par rapport à la moyenne des valeurs d'échantillons déterminés en double sur l'analyseur Roche COBAS MIRA.

Nombre d'échantillons	65	Intervalle des échantillons	0,05 à 19,8 mg/dl
Pente	1,0043	Ordonnée à l'origine	-0,1966
Coefficient de corrélation	0,9957	Équation de régression	$Y = 1,0043 \cdot X - 0,1966$

* Cobas Mira est une marque déposée de Roche Diagnostics Operations, INC., Indianapolis, IN.

Le tableau suivant regroupe les données obtenues en comparant des échantillons équivalents de sérum (x) et de plasma (y) à l'aide du réactif Medica TBIL sur l'analyseur EasyRA. Les données ci-dessous comparent un dosage unique du plasma par rapport à la moyenne des valeurs d'échantillons de sérum déterminées en double.

Nombre d'échantillons	62	Intervalle des échantillons	0,17 à 16,78 mg/dl
Pente	0,9952	Ordonnée à l'origine	-0,0079
Coefficient de corrélation	0,9998	Équation de régression	$Y = 0,9952 \cdot X - 0,0079$

Imprécision (CLSI, EP5-A2)

Des mesures doubles de chacun des trois niveaux du matériel de contrôle de qualité ont été testées deux fois par jour pendant 20 jours. La précision intra-série et la précision totale ont été déterminées à partir de ces données.

Imprécision intra-série :

Taux du CQ mg/dl	DS intra-série mg/dl	CV intra-série %
3,36	0,02	0,67
1,66	0,02	1,13
0,44	0,01	2,64

Imprécision totale :

Taux du CQ mg/dl	DS imprécision totale mg/dl	CV imprécision totale %
3,36	0,05	1,35
1,66	0,03	2,09
0,44	0,02	3,81

Linéarité (NCCLS, EP6-A)⁹

Linéarité comprise entre 0,08 et 20 mg/dl, en fonction de la régression linéaire $Y = 0,98 \cdot X + 0,0921$.

Limite du blanc (LdB) :	0,04 mg/dl	(CLSI, EP17-A)
Limite de détection (LD) :	0,06 mg/dl	(CLSI, EP17-A)
Limite de quantification (LQ) :	0,05 mg/dl	(CLSI, EP17-A)

Substances interférentes (CLSI, EP7-A)

Une interférence inférieure à 10 % est désignée par « aucune d'interférence significative ».

Il existe une interférence significative pour un taux d'hémoglobine supérieur à 125 mg/dl.

Il peut y avoir une interférence significative liée aux triglycérides. Ne pas utiliser d'échantillons lipémiques.

Il y a une interférence positive significative du vert d'indocyanine.

Des échantillons contenant des niveaux élevés d'immunoglobuline M (IgM) ou des échantillons de patients atteints de macroglobulinémie de Waldenström peuvent produire des résultats peu fiables.

Young fournit une liste de médicaments et autres substances qui interfèrent avec les tests cliniques chimiques.⁷

RÉFÉRENCES

1. Malloy H.T. and Evelyn, K.A., *The Determination of Bilirubin with the Photoelectro Colorimeter.*, J.Biol. Chem 119:481-490 (1973).
2. Jendrassik, L and Grof.P. *Vereinfachte, Photometrische Methoden zur Bestimmung des Blubilirubins*, Biochem. A. 297: 81-89 (1938)
3. Walters, M. and Gerarde, H. *An Ultramicromethod for the Determination of Conjugated and Total Bilirubin in Serum or Plasma*. Microchem. J. 15:231-243 (1970).
4. Winsten, J. and Cehelyk, B., *A Rapid Micro Diazo Technique for Measuring Total Bilirubin.*, Clin. Chem. Acta 25: 441-446 (1969).
5. Henry, R.J. *Clinical Chemistry, Principles and Technics*, Hagerstown, MD: Harper and Row, Publishers 1974:1058.
6. Tietz NW. *Textbook of Clinical Chemistry*, WB Saunders and Co., Philadelphia, PA, 1986: p1388.
7. Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests* 4th ed. Washington, DC: AACC Press; 1995.
8. Young DS. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*. 2nd ed. Washington, DC. AACC Press; 1997.
9. Documentation de Medica.
10. Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. (Eds), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1994)
11. NCCLS EP9-P
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, *User Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices* (NCCLS) Document EP5-T2 (ISBN 1-56238-145-8), 1992.

Paramètres du dosage (TBIL) EasyRA

Longueur d'onde principale (nm)	550
Longueur d'onde secondaire (nm)	600
Mode réactionnel	Point final (2)
Sens réactionnel	Croissant
Blanc du réactif	Oui (à chaque étalonnage)
Blanc de l'échantillon	Oui
Durée de la réaction	5,6 min
Intervalle d'étalonnage (maximum)	7 jours
Stabilité du réactif à bord	28 jours

Sérum / Plasma

Volume de l'échantillon (µl)	8,0
Volume du diluant 1 (µl)	15
Volume du diluant 2 (µl)	15
Volume du réactif R1 (µl)	150
Volume du réactif R2 (µl)	38
Emplacements décimaux (valeurs par défaut)	2
Unités (valeurs par défaut)	mg/dl
Facteur de dilution	1:1 (pour augmenter l'intervalle de dosage)
Linéarité	0,08 à 20 mg/dl



Medica Corporation, 5 Oak Park Drive
Bedford, Massachusetts 01730-1413 USA



Emergo Europe, Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem, The Netherlands